

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ROBERTA PESSOA SIMÕES**

**FARMACÊUTICA**

**EFEITO DO DICLOFENACO SÓDICO  
SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA E  
TECIDUAL DA AMOXICILINA  
E SOBRE A INFECÇÃO ESTAFILOCÓCICA.  
ESTUDO *IN VIVO*, EM RATOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Mestre  
em Odontologia - Área de Farmacologia,  
Anestesiologia e Terapêutica.

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**

**Banca examinadora: Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade**

**Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 02 / 05 / 2000

*Assinatura do Orientador*

**PIRACICABA - SP**

**2000**

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE \_\_\_\_\_  
 N.º CHAMADA: UNICAMP  
Si51e  
 V. \_\_\_\_\_  
 TOMBO Nº 41458  
 PROC. 278100  
 C ☐ ☐ ☒ ☐  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 11-07-00  
 N.º CPD \_\_\_\_\_

CM-00143182-8

### Ficha Catalográfica

Si51e

Simões, Roberta Pessoa.

Efeito do diclofenaco sódico sobre a concentração sérica e tecidual da amoxicilina e sobre a infecção estafilocócica. Estudo *in vivo*, em ratos. / Roberta Pessoa Simões. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.

92p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antibióticos beta-lactâmicos. 2. Diclofenaco. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4. Agentes antibacterianos. 5. Medicamentos – Biodisponibilidade. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ROBERTA PESSOA SIMÕES**

FARMACÊUTICA

**EFEITO DO DICLOFENACO SÓDICO  
SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA E  
TECIDUAL DA AMOXICILINA E  
SOBRE A INFECÇÃO ESTAFILOCÓCICA.  
ESTUDO *IN VIVO*, EM RATOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre em Odontologia  
- Área de Farmacologia, Anestesiologia e  
Terapêutica.

**PIRACICABA – SP**

**2000**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2000, considerou a candidata ROBERTA PESSOA SIMÕES aprovada.

1. Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "F. C. Groppo", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. FERNANDO DE SÁ DEL FIOLE

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "F. de Sá del Fiole", written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "E. Dias de Andrade", written over a horizontal line.

## **DEDICATÓRIA**

**A DEUS, todo poderoso e misericordioso, fonte de toda sabedoria, foi ele quem deu aos homens a ciência, para que se glorifiquem por desvendar os prodígios do Senhor.**

Ao meu marido Júnior e a meus filhos Marcela, Natalie e Miguel pela espera paciente ao me ver distante pelo entendimento das ausências durante o período de elaboração deste trabalho, pelo constante carinho, incentivo, ajuda nos momentos difíceis, e pelo que representam em minha vida.

A meus pais WALTER E NÉIA, para quem cada vitória minha representou toda a esperança de uma vida.

Aos meus queridos Familiares, JACO, DIRCE E CLÁUDIA pelo constante apoio e carinho.

Aos meus irmãos, WALTER, RODRIGO E RAPHAELA pelo muito que me incentivam e torcem por mim.

dedico este trabalho.

---

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A FRANCISCO CARLOS GROPPPO, amigo sincero, orientador solícito de todas as horas, incentivador a todo o momento, minha gratidão a você que repartiu comigo os seus conhecimentos, vibrou com meu sucesso e mostrou que os limites existem para que possamos vencê-los; meu profundo respeito e admiração.

---

## **AGRADECIMENTOS**

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, por meio do Reitor:  
HERMANO DE MEDEIROS FERREIRA TAVARES.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP - UNICAMP),  
por meio do Diretor: ANTÔNIO WILSON SALLUM.

À Coordenação Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, por meio  
de sua Coordenadora ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY.

A PEDRO LUIZ ROSALEN, Coordenador do Curso de Pós-Graduação  
em Odontologia, exemplo de profissionalismo e retidão.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, por meio de seu  
Chefe de Departamento: MARIA CRISTINA VOLPATO, incentivadora e  
profissional sempre.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

À CAPES, Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal Especializado, pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho.

A THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, que em poucas palavras exprime todo o seu conhecimento profissional e de vida.

A EDUARDO DIAS DE ANDRADE, mestre exemplar.

AO CENTRO DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS DA UNICAMP (CPQBA).

À VERA RHEDER, ADILSON SARTORATTO, SINÉSIO BOAVENTURA E MARILI VILLA RODRIGUES do CPQBA, "Há um grande traço que marca o caráter, a modéstia das pessoas de talento".

A CELSO PAULINO DA COSTA, imprescindível incentivador.

A JOSÉ RANALI, pelo incentivo e apoio.



---

Aos amigos de mestrado e doutorado JULIANA CAMA RAMACCIATO, ALINE PACHECO, RODRIGO CECANHO, REGINA PERES, YNARA BOSCO, FLÁVIA FLÓRIO, FERNANDA BIANCHINI, SINVALDO BAGLIE, ROSANA e LUCIANE, que tanto colaboraram comigo e que juntos passamos por esta importante fase de nossas vidas.

Ao Sr. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, técnico do Laboratório de Farmacologia, pelo auxílio na fase experimental.

À Srta. MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária efficientíssima da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela dedicação em todos os momentos.

À Srta. HELOISA MARIA CECCOTTI, bibliotecária da FOP, pela revisão bibliográfica.

À Srta. ÉRICA ALESSANDRA PINHO, secretária da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela solicitude e presteza de seus serviços.

---

Ao CECI – UNICAMP, por cuidar do meu menino com muito carinho e dedicação enquanto eu trabalhava no desenvolvimento deste trabalho.

Aos ANIMAIS, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade.

Aos amigos e pessoas, que direta ou indiretamente, embora não citados me incentivaram e apoiaram durante o trabalho.

## SUMÁRIO

	página
<b>LISTAS</b>	<b>13</b>
LISTA DAS ILUSTRAÇÕES PRESENTES NO TEXTO.	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>25</b>
2.1. INFLAMAÇÃO CRÔNICA COMO MODELO DE ESTUDO	25
2.2. OS SÍTIOS DA INFECÇÃO	26
2.3. COMO MEDIR A SENSIBILIDADE	27
2.4. O USO CORRETO DE ANTIMICROBIANOS	28
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.6. AMOXICILINA	32
2.7. DICLOFENACO SÓDICO	36
2.8. FARMACOCINÉTICA DOS ANTIMICROBIANOS	39
2.9. MEDIÇÃO DE NÍVEIS TECIDUAIS DE DROGAS	42
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	<b>45</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>47</b>
4.1. ANIMAIS	47
4.2. MICRORGANISMO	47
4.3. DISCOS	48
4.4. MEIOS DE CULTURA	48
4.5. FÁRMACOS UTILIZADOS	49
4.6. OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO	50
4.7. INFECÇÃO DOS TECIDOS GRANULOMATOSOS	51
4.8. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	51
4.9. OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $10^8$ E $10^{10}$ u.f.c./mL	53
4.10. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO	54
4.11. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E GRANULOMAS	55
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>
ANEXO 1	87
ANEXO 2	88
ANEXO 3	90
ANEXO 4	92

**LISTAS**

Lista das ilustrações presentes no texto.

	página
Figura 1 Agulha utilizada para introdução do fármaco por via intragástrica.	<b>52</b>
Gráfico 1 Médias dos pesos (em mg) dos tecidos granulomatosos.	<b>59</b>
Tabela 1 Diâmetros em mm dos halos de inibição correlacionados com as concentrações de amoxicilina em µg pelas quais foram obtidos.	<b>60</b>
Gráfico 2 Curva padrão ou de regressão, traçada através da correlação entre as médias de diâmetros de halo de inibição e o logaritmo das concentrações de amoxicilina.	<b>61</b>
Gráfico 3 Médias das concentrações teciduais de amoxicilina nos grupos 1, 2 e 3.	<b>62</b>
Gráfico 4 Médias das concentrações séricas de amoxicilina nos grupos 1, 2 e 3.	<b>63</b>
Gráfico 5 Médias das contagens de microrganismos/g de tecido, nos grupos de estudo.	<b>64</b>
Tabela 2 Pesos úmidos (em mg) dos tecidos granulomatosos dos grupos estudados.	<b>87</b>

- Tabela 3 Valores de halo de inibição (em mm) obtidos com as amostras de tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo. **88**
- Tabela 4 Valores de concentração tecidual de amoxicilina (em  $\mu\text{g/g}$ ) obtidos com os valores constantes na Tabela 3 através da curva padrão. **89**
- Tabela 5 Valores de halo de inibição (em mm) obtidos com as amostras sangüíneas, provindas dos animais e a média dentro de cada grupo. **90**
- Tabela 6 Valores de concentração sérica de amoxicilina (em  $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos com os valores constantes na Tabela 5 através da curva padrão. **91**
- Tabela 7 Número de unidades formadoras de colônias/grama de tecido obtidos com as amostras, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo. **92**

Lista das abreviaturas presentes no texto:

%	por cento
&	E
±	mais ou menos
µg	Micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	Micro litro
ASC	área sob a curva
ATCC	American Type Culture Collection (coleção americana de culturas)
BHI	Brain Heart Infusion (infuso de cérebro coração)
CBM	concentração bactericida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
cm	Centímetro
C <sub>máx</sub>	concentração máxima
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
e.p.m.	erro padrão da média
<i>et al.</i>	e outros
g	Gramma
g/dia	grama por dia
H	Hora
mg	Miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/kg/dia	miligrama por quilograma por dia
mg/L	miligrama por litro
MHA	Mueller Hinton Agar (ágar Mueller Hinton)
MHB	Mueller Hinton Broth (caldo Mueller Hinton)
microrganismos/mL	número de microrganismos por mililitro
min	Minuto
mm	Milímetro
nm	Nanometro
°C	graus Celsius
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica
PVC	Policlorovinil
SMA	Salt Manitol Ágar
S.P.F.	Specific Pathogen Free (Livre de patógenos específicos)
rpm	rotações por minuto
T <sub>1/2</sub>	tempo de meia vida
TSA	Tryptone Soya Agar (Ágar Triptona Soja)
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
u.f.c./mL	unidades formadoras de colônias por mililitro

---

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo observar o efeito da amoxicilina, do diclofenaco sódico e da associação de ambos sobre a infecção estafilocócica induzida em tecidos granulomatosos, em ratos. Também foram avaliadas as concentrações sérica e teciduais da amoxicilina, observando o efeito da associação do diclofenaco sódico sobre as mesmas. Trinta animais receberam implantes de quatro esponjas de poliuretana subcutâneamente no dorso e, após 14 dias, dois dos tecidos resultantes (posicionados caudalmente) receberam 0,5mL de um inóculo de  $10^8$  ufc/mL de *S. aureus* ATCC 25923. Dois dias após, os animais foram divididos em grupos de seis, os quais receberam uma dose única de amoxicilina 50mg/kg/vo (grupo 1), amoxicilina 25 mg/kg/vo (grupo2), diclofenaco sódico 2,5mg/kg/im (grupo 3), diclofenaco sódico 2,5mg/kg/im + amoxicilina 50mg/kg/vo (grupo 4) e soro fisiológico 1mL/animal/vo (controle). Após 6h, dois tecidos granulomatosos (posicionados em direção à cabeça) e 10 µL de soro sangüíneo foram obtidos de cada animal, os quais foram dispostos em diferentes placas com MHA semeado com  $10^8$  ufc/mL de *S. aureus* ATCC 25923. Após incubação, foram medidos os halos de inibição proporcionados pelos tecidos granulomatosos e pelo soro sangüíneo. Dez microlitros, provenientes dos tecidos infectados após dispersão com auxílio de sonicador em tubos de ensaio contendo 10mL de NaCl foram distribuídos em placas contendo ágar salt manitol; permitiram a contagem

---

do número de microrganismos em cada grupo. Os resultados mostraram concentrações teciduais de amoxicilina de 6,6 µg/g para o grupo 1; 2,8µg/g para o grupo 2 e 0,8 µg/g para o grupo 4. As concentrações séricas do antimicrobiano encontradas foram 11,6 µg/mL para o grupo 1; 5,4µg/mL para o grupo 2 e 1,3µg/mL para o grupo 4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o número de microrganismos dos grupos 1, 2 e 4. Entretanto, estes foram significativamente diferentes do controle e do grupo 3, os quais foram diferentes entre si. Foi concluído que, embora o diclofenaco sódico (grupo 4) tenha diminuído a concentração tecidual da amoxicilina, a concentração resultante foi suficiente para permitir uma redução do número de microrganismos viáveis similar à observada nos grupos 1 e 2.

PALAVRAS-CHAVE: antibióticos      beta-lactâmicos,      biodisponibilidade      de medicamentos, diclofenaco sódico, amoxicilina, testes de sensibilidade microbiana, agentes antimicrobianos



## **ABSTRACT**

The aim of this work was to observe the effect of the amoxicillin, sodium diclofenac and amoxicillin plus sodium diclofenac against staphylococcal infection in granulomatous tissues. Four polyurethane sponges placed under the back skin of thirty rats induced these tissues. After 14 days two tissues (tail position) received 0.5 mL of  $10^8$  ufc of *S. aureus* ATCC 25923/mL. Two days after, the animals were divided into five groups of six each. Group 1 received an only dose of amoxicillin 50mg/kg/po, group 2 received amoxicillin 25mg/kg/po, group 3 received sodium diclofenac 2.5mg/kg/im, group 4 received sodium diclofenac 2.5mg/kg/im plus amoxicillin 50mg/kg/po, and group 5 (control group) received NaCl 1mL/po. After six hours of drug administration, two tissues of each animal were removed. Blood was collected from cervical plexus and centrifuged. Then, 10µL of serum were placed on paper disks. These disks and tissues were placed on dishes with Mueller Hinton agar inoculated with  $10^8$  ufc of *Staphylococcus aureus*/mL. The dishes were incubated over 18 hours, and the inhibition zones were measured. The infected granulomatous tissues were placed in 10mL of NaCl, and dispersed by sonic system. Ten microliters of this suspension were spread on salt manitol agar dishes. The resulting microorganisms were counted after the incubation. Results showed tissue concentrations of amoxicillin of 6.6 µg/g for group 1; 2.8µg/g for group 2, and 0.8 µg/g for group 4. Serum concentration of

---

amoxicillin showed 11.6 µg/mL for group 1; 5.4µg/mL for group 2, and 1.3µg/mL for group 4. Statistically significant differences among the number of microorganisms groups 1, 2, and 4 were not observed. However, these previous groups were statistically different from groups 3 and 5, which were statistically different from each other. It was concluded that, although sodium diclofenac (group 4) reduced amoxicillin concentration in the tissue, the resulting concentration was enough to reduce the count of microorganism. Also, the number of microorganisms of group 4 was similar to the one observed in groups 1 and 2.

KEY WORDS: beta-lactamics antibiotics, drugs bioavailability, amoxicillin, antimicrobial susceptibility testing, diclofenac sodium, antimicrobial agents.

### 1. INTRODUÇÃO

A amoxicilina é um importante componente do arsenal terapêutico antimicrobiano. A recente reedição das normas para profilaxia da endocardite bacteriana da *American Heart Association* (DAJANI *et al.*, 1997) é um exemplo claro deste fato.

A amoxicilina, dentre os beta-lactâmicos, tem um papel importante devido ao seu espectro de ação, sua excelente absorção por via oral, sua baixa taxa de efeitos colaterais e sua boa penetração tecidual (AMATO-NETO *et al.*, 1985; FONSECA, 1988).

Poucos são os dados a respeito da concentração tecidual que a amoxicilina atinge, uma maior ênfase sempre é dada aos níveis séricos da droga.

Apesar de existir concordância de que, para que seja efetivo, a amoxicilina ou um outro antibiótico qualquer, deva ultrapassar em níveis séricos a concentração inibitória mínima de um dado patógeno, não é no sangue que a maioria das infecções se desenvolve.

Dentre as metodologias disponíveis para a sua dosagem no soro, podem ser destacadas a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), métodos físico-químicos (iodometria, mercurimetria), espectrofotometria em ultravioleta e o método microbiológico (KOROLKOVAS, 1988). Para estes métodos citados, no

entanto, existe normalmente a necessidade de homogeneização tecidual, o que poderia resultar na quebra da ligação entre os antimicrobianos e proteínas plasmáticas ou teciduais. Este procedimento poderia conduzir a resultados muitas vezes errôneos, pois, frações da droga que normalmente não atuariam por estarem ligadas, tornam-se ativas e, portanto, disponíveis para dosagem (DAVEY, 1990).

O diclofenaco sódico é um antiinflamatório não esteroidal (AINE), com alto grau de atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (MORAN, 1990; FRANCO, 1994), derivado do grupo do ácido fenilacético, cujo mecanismo de ação é atribuído à inibição da ciclooxigenase, da prostaglandina sintetase, da migração leucocitária para o sítio inflamatório e da produção de ânions superóxidos (TODD & SORKIN, 1988; PERIANIN *et al.*, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986).

A associação entre fármacos antimicrobianos e antiinflamatórios não tem sido bem avaliada. Embora, não pareça lógica esta associação, não é incomum na clínica diária o cirurgião dentista prescrever antimicrobianos em pacientes que já fazem uso de antiinflamatórios. Como estes fármacos podem deprimir os mecanismos de defesa do organismo, poderia ser esperado algum grau de comprometimento da terapia antimicrobiana.

Desta forma, o presente trabalho pretendeu estimar as concentrações séricas e teciduais da amoxicilina, bem como seu efeito sobre a infecção

estafilocócica induzida em ratos e os efeitos sobre estes parâmetros da associação de amoxicilina ao diclofenaco sódico.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 - INFLAMAÇÃO CRÔNICA COMO MODELO DE ESTUDO**

Os modelos experimentais que utilizam a reação inflamatória a algum corpo estranho, usualmente implantado via subcutânea e estudam o impacto de fármacos sobre este processo, são chamados de modelos *ex vivo* (ZAK & O'REILLY, 1991).

A implantação de corpos estranhos resulta na encapsulação dos mesmos por tecido granulomatoso ou fibrinoso. Este tipo de material permite a difusão de antimicrobianos e a entrada de fagócitos e anticorpos, ocasionando uma oportunidade para se examinar a efetividade de antimicrobianos conjuntamente com as células e fluidos biológicos do hospedeiro (ZAK & O'REILLY, 1991).

Estes modelos podem ser válidos para determinação da capacidade de um antimicrobiano em penetrar em locais específicos de infecção, seu nível bactericida, seu efeito na fisiologia e morfologia da bactéria e a possibilidade da ocorrência de seleção ou resistência bacteriana (ZAK & O'REILLY, 1991).

A introdução de material estranho no organismo animal tem sido prática comum para permitir estudos onde o grau de fibrosamento e encapsulamento da lesão sejam importantes (GEVARTOSKY, 1984).

Estes materiais podem ser câmaras, discos e tiras de algodão. Eles têm sido usados para estudar a farmacocinética e a penetração de antimicrobianos em sítios extravasculares em humanos e animais. Em combinação com outros ensaios, essas técnicas podem fornecer detalhes e dados farmacocinéticos para muitos antimicrobianos (RENNEBERG, 1988).

Dentre os vários métodos utilizados para indução do tecido granulomatoso, a implantação de esponjas de policlorovinil (PVC), como agente desencadeador, no dorso de animais, tem sido um método utilizado (GRINDLAY & WAUGH, 1951; HICKS, 1969; VIZIOLI, 1973; ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; BARROS, 1989; MATTOS-FILHO, 1990; MATTOS-FILHO *et al.*, 1994; GROPPPO, 1996). Esse tecido tem morfologia e seqüência de formação bem estudada. Os fenômenos morfológicos envolvidos com seu desenvolvimento já foram descritos (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990).

## 2.2 – OS SÍTIOS DA INFECÇÃO

Existem evidências substanciais de que muitas infecções resultam de organismos que aderem às superfícies. A maior parte das bactérias não produz efeitos patogênicos em fluidos corpóreos, são encontradas em fluidos como resultado da difusão a partir do local de infecção, da contaminação provinda de instrumentação ou da ruptura do tecido (LORIAN, 1989).

---

A primeira linha de defesa do organismo contra a invasão bacteriana é a fagocitose por células polimorfonucleares que requerem uma superfície para exercer sua atividade (LORIAN, 1989), portanto situa-se no tecido o local da verdadeira batalha contra os agentes patogênicos.

Para o sucesso da terapia com base em antimicrobianos, alguns aspectos devem ser observados tais como o conhecimento da sensibilidade do agente etiológico; as suas propriedades farmacológicas; a sensibilidade do microrganismo isolado em relação a outras cepas da mesma espécie, etc. (AMATONETO *et al.*, 1985).

## **2.3 - COMO MEDIR A SENSIBILIDADE**

Fleming, na década de 20, foi o primeiro a realizar um teste de sensibilidade microbiana (para o *Staphylococcus aureus* e penicilina), embora a ação de um microrganismo inibindo o crescimento de outro fosse primeiramente observada por Van Leeuwenhoek, em 1676 (BALOWS, 1974).

Muitos procedimentos, baseados na possibilidade de um agente antimicrobiano difundir-se por meio do ágar e inibir o crescimento de uma bactéria, foram descritos. Discos de papel, de 6,5 mm de diâmetro, como os usados hoje, foram descritos primeiramente por BONDI *et al.*, em 1947.



Em 1966, BAUER *et al.* descreveram procedimentos padronizados para realizar o teste de sensibilidade em discos e comparar os diâmetros dos halos com a concentração inibitória mínima.

Para determinar a atividade de um agente antimicrobiano podem ser feitos testes de difusão em meios de cultura. O antimicrobiano é aplicado à placa de Petri contendo o meio semeado, através de discos de papel contendo uma quantidade precisa da droga ou pela adição de uma solução de antimicrobiano a um “poço” (técnica do poço) aberto no meio de cultura. Cilindros de metal ou vidro, aplicados sobre a superfície do meio, são raramente usados nos dias atuais (PIDDOCK, 1990).

### 2.4 - O USO CORRETO DE ANTIMICROBIANOS

A razão risco-benefício da terapia antimicrobiana (toxicidade x eficácia) deve ser considerada individualmente para cada paciente. Agentes antibacterianos devem ser prescritos para pacientes quando uma infecção bacteriana não está sendo controlada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou se houver indicação para a profilaxia de uma infecção. O uso excessivo de antimicrobianos para infecções menores e doenças não-bacterianas, submete o paciente à toxicidade da droga, a possibilidade de superinfecção e também o desenvolvimento de variantes resistentes (KARLOWSKY *et al.*, 1993).

Para infecções de menor gravidade, como a maioria das infecções odontogênicas, os antimicrobianos devem ser administrados apenas se houver comprometimento sistêmico do hospedeiro, o qual pode ser verificado pela presença de febre, mal-estar, etc (ANDRADE, 1999).

A eficácia de um tratamento com quaisquer antimicrobianos depende da correta identificação do(s) microrganismo(s) infectante(s) e da escolha da droga mais eficaz. Porém, os antimicrobianos sozinhos não erradicam uma infecção, mas causam redução no número de microrganismos viáveis, quer inibindo sua proliferação (bacteriostáticos), quer provocando a morte dos mesmos - bactericidas (MONTGOMERY, 1991a).

Embora os testes de cultura e sensibilidade realizados com material colhido das infecções bacterianas das feridas tenham preferência, o tratamento empírico com antimicrobianos, quando necessário, pode ser instituído com confiança, pois as etiologias bacterianas mais comuns já são bem conhecidas (TOPAZIAN & GOLDBERG, 1987).

Quando o paciente está com os mecanismos de defesa prejudicados, deve-se sempre preferir um agente bactericida, o qual exige menos do sistema orgânico. Estes agentes normalmente não necessitam de manutenção constante nos níveis sanguíneos, sendo que a concentração letal mínima causa lise em bactérias sensíveis. Por isso, a dose adequada pode ser dividida em intervalos

---

regulares apenas durante o dia (KARLOWSKY *et al.*, 1993).

## **2.5 - *Staphylococcus aureus***

É o mais importante agente causador de patologias infecciosas dentre os estafilococos. Entretanto, este microrganismo faz parte da microbiota normal humana, podendo causar infecções oportunistas significantes sob condições apropriadas (CARNEY *et al.*, 1985; WALDVOGEL, 1990). Frequentemente é isolado de infecções em feridas pós-cirúrgicas, as quais podem servir como nicho, possibilitando o desenvolvimento de infecções sistêmicas (KONEMAN *et al.*, 1992).

Para a amoxicilina a concentração inibitória mínima capaz de inibir o desenvolvimento de cepas de *S. aureus* sensíveis está na faixa de 0,06 µg/mL a 1µg/mL (PHILIPS *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998).

Atualmente, essas bactérias adquiriram importância ainda maior a partir da observação de que a incidência de endocardite estafilocócica tem aumentado drasticamente. Cepas de *S. aureus*, sensíveis aos beta-lactâmicos, são os agentes etiológicos responsáveis pela moléstia em mais de 70% da doença diagnosticada em pacientes que fazem uso de drogas por via endovenosa. Outra razão é o fato de que os estafilococos são patógenos importantes para as infecções hospitalares (MCCARTNEY,1992).

---

Cerca de 30% de todas as infecções causadas pelo *S. aureus* são devidas à microbiota endógena (PERL & GOLUB, 1998).

ROMAN *et al.* (1997) observaram que cepas de *S. aureus* têm propensão em produzir doenças epidêmicas de rápida difusão dentro das instituições de saúde.

KAMIYA (1997) argumenta que o uso intensivo de drogas de amplo-espectro, especialmente no tratamento de um crescente número de pacientes idosos e imunocomprometidos, resulta numa emergencial e expansiva resistência nos microrganismos. Um dos principais patógenos identificados dentro desta característica vem sendo as cepas de *S. aureus* metilicina-resistentes (MRSA).

FARIAS *et al.* (1997) avaliaram o padrão de sensibilidade de cepas de *S. aureus* oxacilina-susceptíveis e oxacilina-resistentes a agentes antimicrobianos comumente utilizados em infecções causadas por estes patógenos. As cepas (117) foram isoladas de vários hospitais em São Paulo, Campinas e João Pessoa. Obtiveram a concentração inibitória mínima para 24 agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc. Os resultados mostraram uma alta e preocupante taxa de resistência entre as cepas de *S. aureus* obtidos nos hospitais brasileiros. Poucas drogas podem ainda ser efetivas contra doenças infecciosas provocadas por este microrganismo.

## **2.6 - AMOXICILINA (*alfa-amino-p-hidroxibenzilpenicilina*)**

É um derivado semi-sintético da penicilina, muito semelhante à ampicilina e igualmente sensível à penicilinase. Contudo, difere da ampicilina por conter uma hidroxila a mais, em sua molécula (FONSECA, 1988), sendo comparável em espectro antibacteriano e atividade *in vitro*, promovendo maiores concentrações séricas após doses orais equivalentes (CROYDON & SUTHERLAND, 1970; NEU & WINSHELL, 1970a; NEU & WINSHELL, 1970b; SUTHERLAND & ROLISON, 1970).

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese da parede celular, de forma semelhante à penicilina G, diferindo pela maior capacidade de penetração nas barreiras lipídicas, principalmente em gram-negativos. Atua também na parede celular mais complexa, atingindo enzimas localizadas na face externa da membrana celular bacteriana (MONTGOMERY, 1991b).

É utilizada normalmente pela via oral, na forma de triidrato, sendo 90% da dose administrada absorvida, em média. Quando absorvida, não sofre modificações moleculares provocadas pelo organismo e provê concentrações séricas (ligação plasmática - 17%) e teciduais duas vezes maiores que a ampicilina (NEU, 1982; AMATO-NETO *et al.*, 1985; FONSECA, 1988; NIX, 1991; BÔER *et al.*, 1995).

NEU & WINSHELL (1970b) reportaram um pico médio no soro de 7,6µg/mL após administração oral de 500mg de amoxicilina para voluntários, e 3,8µg/mL para ampicilina. Picos consideravelmente maiores, 10,8 µg/mL para a amoxicilina e 6,3µg/mL para ampicilina, foram encontrados com as mesmas doses, em outro estudo (CROYDON & SUTHERLAND, 1970).

A alimentação não afeta as concentrações plasmáticas da amoxicilina (DAJANI *et al.*, 1994).

A excreção é feita pela urina em sua forma ativa, sendo que a amoxicilina tem maior taxa de excreção do que a ampicilina (CROYDON & SUTHERLAND, 1970; NEU & WINSHELL, 1970a).

Quanto a seus efeitos colaterais, pode-se dizer que é mais bem tolerada quando em uso oral do que seus similares, provocando menos náuseas, vômitos e diarreia (FONSECA, 1988).

Distribui-se bem por todo o organismo, tendo inclusive demonstrado boa penetração por meio da "barreira hemoliquórica" e boa transferência materno-fetal, atingindo no sangue fetal níveis dentro dos limites terapêuticos.

As doses habitualmente empregadas são da ordem de 250 a 500 mg, de 8/8 horas, 6/6 horas ou ainda 12/12 horas, perfazendo um total de 1 a 2g/dia. Em crianças é utilizada na dose de 25 a 50 mg/kg/dia (AMATO-NETO *et al.*, 1985). Em

prematturos na primeira semana de vida ou neonatos com menos de 32 semanas, a dosagem máxíma é de 25mg/kg a cada 12 horas (BÔER *et al.*, 1995).

É considerado um antimicrobiano de amplo espectro, atuando inclusive contra bacilos gram-negativos (FONSECA, 1988).

Pode atuar contra os seguintes microrganismos (FONSECA, 1988; KARLOWSKY *et al.*, 1993):

1. Microrganismos anaeróbios, aeróbios e facultativos gram-positivos (eficácia ligeiramente menor que a penicilina V);
2. Cocos aeróbios gram-negativos (eficácia superior à penicilina V);
3. Bacilos aeróbios gram-negativos (não atua contra *Proteus* indol-positivos, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia* e *Pseudomonas*).

É eficaz como antimicrobiano de primeira escolha em regimes de profilaxia contra endocardite bacteriana, para procedimentos dentais, bucais ou do trato respiratório superior, em pacientes que apresentem riscos para esta patologia. Neste caso o regime padrão adotado para adultos é composto por uma dose de 2g do fármaco, por via oral, 1 hora antes do procedimento. Esta conduta é recomendada pela *American Heart Association* (DAJANI *et al.*, 1997).

DAJANI *et al.* (1994) observaram a farmacocinética da amoxicilina administrada em seres humanos. Após uma única dose de dois ou três gramas (20

a 60 mg/kg em função dos pesos dos voluntários), os autores mediram as concentrações plasmáticas após 1, 2, 4 e 6 horas. Encontraram para a dose relativa de 40 mg/kg, respectivamente 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7 µg/mL. A metodologia empregada preconizava o uso de um cromatógrafo líquido de alta performance. Os autores argumentam que as doses utilizadas ultrapassaram a concentração inibitória mínima para os estreptococos orais, durante todos os períodos estudados.

AKIMOTO *et al.* em 1982, utilizando uma dose de 500mg de amoxicilina, relataram que o fármaco penetrou melhor na maxila (1,84 µg/g) que na mandíbula (0,95 µg/g), porém as concentrações obtidas em ambos locais eram menores que no soro (5,99 µg/mL). Entretanto, em pus de abscessos causados por infecções odontogênicas, sua concentração (0,90 µg/mL após 1,5h) excedia o MIC90% para estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos (AKIMOTO *et al.*, 1994).

Existem várias metodologias utilizadas para a determinação da concentração de amoxicilina, as quais dependem basicamente do grau de precisão necessário, do tipo de meio onde o antimicrobiano está presente (cápsulas, tecido, sangue etc.) e da disponibilidade de equipamento para a dosagem (HSU & HSU, 1992).

Dentre os métodos empregados para tal fim, podem ser citados a titulação com nitrato de mercúrio (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988), método



microbiológico, ensaio iodométrico e método óptico (US PHARMACOPEIA, 1990) e espectrofotométrico (DEVANI *et al.*, 1992). Para a determinação em fluidos biológicos, vários autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta performance (HSU & HSU, 1992; KRAUWINKEL *et al.*, 1993; CHARLES & CHULAVATNATOL, 1993; MOORE *et al.*, 1996).

Os relatos de comparação entre os métodos, principalmente entre o cromatográfico de alta performance com o microbiológico, apontam para a igualdade de resultados obtidos (HSU & HSU, 1992; MOORE *et al.*, 1996).

CHOMARAT *et al.* (1997) realizaram um estudo sobre as propriedades antimicrobianas e sobre a farmacocinética da amoxicilina em faringites de adultos, observando a eficácia clínica e a segurança da droga. Concluíram que a amoxicilina apresentou excelente penetração nas amídalas, com concentrações séricas e teciduais que excediam a CIM para a maioria dos patógenos encontrados nestes casos, incluindo *S. pyogenes*.

### 2.7 - DICLOFENACO SÓDICO

É um agente antiinflamatório não esteroidal (AINE), com alto grau de atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética, além de ser bem tolerado (MORAN, 1990; FRANCO, 1994). É derivado do grupo do ácido fenilacético, cujo

mecanismo de ação é atribuído à inibição da atividade de ciclooxigenase e prostaglandina sintetase.

Semelhante aos salicilatos, o efeito antiinflamatório do diclofenaco pode resultar da inibição da síntese e liberação de prostaglandinas durante a inflamação. Concentrações altas de diclofenaco podem inibir a formação de outros metabólitos do ácido araquidônico como o ácido 5-HPETE (5 - hidroperoxieicosatetranóico) que origina produtos chamados de leucotrienos e o ácido 5-HETE (5-hidroxeicosatetraenóico) que são estimuladores importantes da quimiotaxia de leucócitos (PERIANIN *et al.*, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986).

Assim o diclofenaco pode inibir a migração leucocitária para o sítio inflamatório (TODD & SORKIN, 1988; KU *et al.*, 1985; KU *et al.*, 1986; FRANCO, 1994) e a produção de superóxidos (TODD & SORKIN, 1988; PERIANIN *et al.*, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986).

O efeito analgésico do diclofenaco parece resultar da inibição da síntese de prostaglandinas periférica e central (MONCADA *et al.*, 1985; ATKINSON & COLLIER, 1980; FERREIRA *et al.*, 1978; FRANCO, 1994).

Alguns pesquisadores sugeriram que o diclofenaco aumenta a liberação de endorfinas da pituitária, o que também contribuiria para o efeito analgésico (MARTINI *et al.*, 1984; SACERDOTE *et al.*, 1985).

A administração do diclofenaco por tempo prolongado não induz a tolerância do efeito analgésico (TODD & SORKIN, 1988; CARDWELL, 1986; ZUCKNER, 1986; FRANCO, 1994).

Embora o efeito antipirético dos AINEs não seja completamente conhecido, foi sugerido o envolvimento da inibição da síntese de prostaglandinas no sistema nervoso central (MONCADA *et al.*, 1985).

A droga afeta também as funções renais (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988; FRANCO, 1994) e exibe efeito antiproteinúrico em número limitado de pacientes com glomerulonefrite e função renal normal (TODD & SORKIN, 1988; FRANCO, 1994).

O diclofenaco causa danos à mucosa gástrica, resultando em ulceração e/ou hemorragia (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988). Tem sido sugerido que a inibição da prostaglandina E<sub>2</sub> seria responsável pelos efeitos gástricos observados (MONCADA *et al.*, 1985; FRANCO, 1994).

A farmacocinética do diclofenaco pode ser interpretada através de um modelo tricompartmental, onde as concentrações plasmáticas declinam de maneira trifásica (WILLIS *et al.*, 1979). O diclofenaco passa por extensiva hidroxilação e subsequente conjugação com o ácido glicurônico, e outros ligantes biogênicos (GEIGY, 1988; RIESS *et al.*, 1978; STIERLIN *et al.*, 1979; FRANCO, 1994).

O diclofenaco é extensa e rapidamente metabolizado no fígado (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988; RIESS *et al.*, 1978; STIERLIN *et al.*, 1979; FRANCO, 1994). Com administração oral ou IV, esta droga é excretada em torno de 50 a 70% na urina e 30 a 35% nas fezes, após 96 horas, sendo somente uma mínima parte (1%) excretada intacta (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988; RIESS *et al.*, 1978; WILLIS *et al.*, 1981; STIERLIN *et al.*, 1979).

Seu principal metabólito é o 4-hidroxi derivado, resultado da hidroxilação do anel aromático, sendo 30 vezes menos ativo que o composto de origem (MENASSÉ *et al.*, 1978).

O diclofenaco também pode passar por hidroxilação do anel fenilacético e subsequente conjugação para formar conjugados de 5-hidroxiclofenaco e 4,5-dihidroxiclofenaco (GEIGY, 1988; RIESS *et al.*, 1978; STIERLIN *et al.*, 1979).

O diclofenaco sódico tem boas propriedades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas e negativas, *in vitro*. A concentração inibitória mínima para a maioria dos microrganismos (397 cepas testadas) foi na faixa de 50 a 100 µg/mL (ANNADURAI, S. *et al.*, 1998).

## 2.8 - FARMACOCINÉTICA DOS ANTIMICROBIANOS

A maioria das drogas difunde-se livremente no fluido intersticial, dentro

dos tecidos, devido às "fenestrações" das paredes capilares. Poucos tecidos são exceções a esta regra, tais como o cérebro, fluido cérebro-espinhal, glândula prostática e humor aquoso (DAVEY, 1990; NIX, 1991).

Para a maior parte das situações clínicas pode-se admitir que os fármacos passam livremente do sangue para o fluido intersticial por meio dos tecidos. Entretanto, a farmacocinética dos antimicrobianos dentro do fluido intersticial e no sangue é completamente diferente. A concentração tecidual normalmente eleva e diminui mais lentamente nas primeiras horas após a administração. As concentrações séricas são mais altas do que os níveis do fluido intersticial, mas eventualmente, com o tempo, o oposto começa a ser verdadeiro (DAVEY, 1990).

Existem muitos fatores farmacocinéticos que influenciam o resultado clínico final, como a concentração máxima de antimicrobiano no local da infecção ( $C_{\text{máx}}$ ), o tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) e a quantidade total do antimicrobiano presente durante o período entre doses (área sob a curva, ASC). No sangue existem proteínas plasmáticas que se ligam aos antimicrobianos e, conseqüentemente, apenas a fração livre do mesmo é farmacologicamente ativa. Considera-se que, se menos de 70% do antimicrobiano estiver ligado a proteínas, então esta ligação não será clinicamente importante com relação à eficácia do mesmo (PIDDOCK, 1990).

A relação entre os parâmetros farmacocinéticos e a CIM é ainda desconhecida, embora os parâmetros possam ser diferentes nas diversas categorias de pacientes. Tem sido sugerido que a  $C_{m\acute{a}x}$  deve ser ao menos igual a CIM (PIDDOCK, 1990).

Clinicamente, poderia considerar-se que um microrganismo é sensível quando morre ou tem seu crescimento inibido, *in vitro*, por determinada concentração do antimicrobiano facilmente atingida, *in vivo*, no local onde se encontra o agente infeccioso ou, via de regra, no sangue do paciente. É considerado resistente o microrganismo que tolera a concentração sérica máxima atingida por doses terapêuticas (AMATO-NETO *et al.*, 1985).

O período de tempo durante o qual o antimicrobiano estará presente em concentrações eficazes, no local da infecção, dependerá da velocidade de inativação da droga por meio do metabolismo, excreção ou ambos. Baseando-se na velocidade normal de biotransformação e excreção a dose será repetida a intervalos específicos, de forma que sejam mantidas as concentrações séricas antibacterianas (MONTGOMERY, 1991a).

A via de administração e a posologia são importantes fatores na determinação da concentração final no local da infecção. Infecções em áreas com suprimento sangüíneo relativamente deficiente, como em abscessos, áreas necróticas e infecções otológicas, bem como em áreas ósseas, são de difícil

tratamento antimicrobiano. Os abscessos podem representar problema ainda maior, pois a infecção está contida pelos mecanismos de defesa do organismo e as bactérias multiplicam-se em velocidade extremamente lenta (MONTGOMERY, 1991a; RENNEBERG, 1988b).

Os fatores que influenciam as concentrações séricas de antimicrobianos são os mesmos que influenciam aos outros fármacos, ou sejam: doses utilizadas, intervalos entre doses, absorção, metabolismo e excreção, entre outros. Uma bactéria isolada de material colhido de um abscesso, por exemplo, que se mostra sensível a determinado antimicrobiano, *in vitro*, pode não responder ao tratamento pelo fato deste não ter acesso à intimidade do abscesso, onde se encontra o agente agressor. Assim, a interação entre antimicrobiano e agente agressor, é sempre muito mais complexa *in vivo* (AMATO-NETO *et al.*, 1985).

### 2.9 - MEDIÇÃO DE NÍVEIS TECIDUAIS DE DROGAS

As concentrações teciduais são usualmente medidas por homogeneização do tecido, o qual consiste de cerca de 80% de células e 20% de fluido. Desta forma, caso a droga concentre-se dentro das células a medida refletirá a concentração citoplasmática, mas não necessariamente aquela do fluido intersticial. Para penicilinas ou cefalosporinas, as concentrações em homogenatos teciduais subestimam concentrações no fluido intersticial em cerca de 25%. Isto é

devido, em grande parte, ao fato de que o volume de homogenato é mascarado por células (DAVEY, 1990).

FISHMAN & HEWITT (1970) e RENNEBERG (1988a) sugerem que a penetração de agentes quimioterápicos nos locais infeccionados, principalmente nas áreas avasculares, abscessos ou matrizes de fibrina, pode ser reduzida e seria um determinante crítico no resultado do tratamento.

Embora as concentrações séricas de antimicrobianos serem comumente equiparadas com efetividade terapêutica em infecções em locais vascularizados (EAGLE *et al.*, 1953; GIBALDI & SCHWARTZ, 1968), é antigo o conceito de que, em processos infecciosos, ricos em fibrina e avasculares, o nível de droga não refletirá aquele do soro (BARZA & WEINSTEIN, 1974; RENNEBERG *et al.*, 1993).

ROBSON *et al.* (1974) argumentam que a base de fibrina, quando presente no tecido granulomatoso, parece evitar a difusão do antimicrobiano para dentro dele. Conclusão semelhante pode ser encontrada em GEVARTOSKY (1984) que estudou histologicamente três antimicrobianos sobre a evolução do tecido granulomatoso em ratos, por meio do implante de esponja de PVC.

PIEPER *et al.* (1985) conduziram um estudo onde observaram a penetração de antimicrobianos em válvulas cardíacas e aurículas, utilizando método microbiológico. Os diâmetros de halo de inibição assim obtidos, foram comparados contra uma curva de regressão (log da concentração x diâmetro do



halo de inibição) convertendo os valores encontrados em miligramas de antimicrobiano.

MATTOS-FILHO *et al.* (1994) observaram, qualitativamente, a penetração tecidual da penicilina G, em camundongos, utilizando tecido granulomatoso obtido pela prévia implantação de esponjas de PVC nos animais. Os autores relatam níveis suficientes do antimicrobiano para inibir o crescimento de *Streptococcus* sp e de *Staphylococcus* sp.

GROPPO (1996) estudou a influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a difusibilidade de diferentes doses de amoxicilina em ratos. Empregou doses de 3, 7, 40 e 80 mg/kg, em períodos de evolução de 7, 14, 21 e 28 dias. O autor não observou diferenças entre os resultados obtidos nos diferentes períodos de tempo, considerando-se uma mesma dose. Para o período de 14 dias e dose única de amoxicilina a 40mg/kg, observou valores de 25,2 mm de halo de inibição, que significou 103 µg/mL para a concentração sanguínea e 26,02 mm de halo de inibição, significando 57,87 µg/mg para a concentração tecidual, após decorrido 1 hora da administração por via oral.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Com o intuito de estudar a farmacocinética da amoxicilina e o impacto da associação do diclofenaco sódico sobre a concentração sérica e tecidual do antimicrobiano, foram objetivos deste trabalho:

1. Estabelecer a concentração sérica da amoxicilina e da sua associação ao diclofenaco sódico, através de método microbiológico.
2. Medir a concentração tecidual da amoxicilina e da sua associação ao diclofenaco sódico, através da análise da difusibilidade das drogas, *in vitro*, utilizando tecido granulomatoso induzido em ratos;
3. Estabelecer correlação entre o nível de atividade antimicrobiana tecidual e o efeito sobre a infecção da amoxicilina e da sua associação ao diclofenaco sódico;
4. Observar o efeito da amoxicilina, do diclofenaco sódico e da associação de ambos sobre a infecção estafilocócica, em tecidos granulomatosos previamente induzidos em ratos;

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **MATERIAL**

#### **4.1 - ANIMAIS**

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus* - albinus, Wistar), adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 150 e 200 g, S.P.F.\*\*\*\*<sup>1</sup>, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os animais permaneceram cerca de uma semana, para adaptação, nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e receberam, nesta fase de adaptação e também durante a fase experimental, ração balanceada comercial<sup>2</sup> e água *ad libitum*.

#### **4.2 - MICRORGANISMO**

O microrganismo utilizado foi o *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923. Esta cepa foi reativada à partir de amostras congeladas a -70°C e sua viabilidade

---

<sup>1</sup> Specific pathogen free - livre de 4 tipos de patógenos.

<sup>2</sup> Purina.

foi constatada através de cultivo em ágar tripticaseína soja (TSA)<sup>3</sup> e coloração pelo método de Gram (segundo KONEMAN *et al.*, 1992).

### **4.3 - DISCOS**

Foram obtidos, por meio da utilização de um perfurador, discos de esponjas de poliuretano, com 12mm de diâmetro por 5mm de altura, os quais foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 min.

Discos de papel de filtro ("blank") comerciais<sup>4</sup>, no diâmetro de 6,2 mm, foram utilizados para o ensaio da concentração sérica e para o estabelecimento da curva de regressão. Estes também foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 min.

### **4.4 - MEIOS DE CULTURA**

O *S. aureus* ATCC 25923 foi mantido em TSA, sendo cultivado a cada sete dias e 24 horas antes de sua utilização. Para a obtenção do inóculo padrão contendo 10<sup>8</sup> ufc/mL, o microrganismo foi inoculado em infuso de cérebro-coração

---

<sup>3</sup> Oxoid Co

<sup>4</sup> Cecon Ind. Bras.

(BHI) <sup>5</sup> e mantido a 37°C em estufa de incubação durante 4 a 6 horas (KONEMAN *et al.*, 1992).

O meio de cultura usado no antibiograma foi o ágar Mueller-Hinton (MHA) <sup>6</sup>. Este meio foi distribuído (22mL) em placas de Petri de vidro, de 150 x 20mm, previamente esterilizadas.

Para a contagem dos microrganismos da infecção induzida foram utilizadas placas de Petri de 50x20mm, contendo 5 mL de Salt Manitol Agar (SMA)<sup>7</sup>.

### **4.5 - FÁRMACOS UTILIZADOS**

Foram utilizadas duas suspensões de amoxicilina triidratada<sup>8</sup> (50mg/mL e 25mg/mL) e uma solução injetável de diclofenaco sódico<sup>9</sup> de 2,5mg/mL.

---

<sup>5</sup> Difco Co.

<sup>6</sup> Oxoid Co.

<sup>7</sup> Difco Co.

<sup>8</sup> Sigma Co.

<sup>9</sup> Voltaren® - Novartis Biociências S/A

## **MÉTODO**

### **4.6 - OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO**

O tecido granulomatoso foi obtido por meio do implante de quatro discos de esponja de poliuretano com 12mm de diâmetro por 5mm de altura, esterilizados, no tecido subcutâneo no dorso dos animais, de acordo com a técnica descrita a seguir:

- 1 - anestesia com éter etílico, em campânula de vidro;
- 2 - tricotomia da região dorsal mediana e anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2%;
- 3 - incisão de aproximadamente 1cm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme, sem invasão de tecido muscular, com tesoura de ponta reta fina;
- 4 - divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba;
- 5 - a introdução das esponjas foi feita longe da incisão, em posições laterais, à esquerda e à direita, 2 em direção à cabeça e 2 em direção à cauda.
- 6 - sutura com dois pontos simples, com fio de algodão número zero.

#### **4.7 - INFECÇÃO DOS TECIDOS GRANULOMATOSOS**

Decorridos 14 dias da implantação, nas esponjas posicionadas caudalmente, foi introduzido 0,5 mL de uma suspensão bacteriana de  $10^8$  ufc de *S. aureus*/mL em solução de cloreto de sódio a 0,9%, previamente ajustada (descrição no item 7.9), através de uma seringa tipo insulina de 1mL com agulha 13x4,5, ambas estéreis. Este procedimento foi efetuado em todos os animais, sendo este dia considerado como dia zero da infecção.

#### **4.8 - ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS**

Decorridos dois dias da infecção, os animais foram separados em 5 grupos distintos, de seis animais cada um:

**Grupo 1** -Amoxicilina 50: aos animais deste grupo foi administrada uma suspensão de amoxicilina que proporcionou uma dose de 50 mg/kg, por via intragástrica.

**Grupo 2** -Amoxicilina 25: aos animais deste grupo foi administrada uma suspensão de amoxicilina que proporcionou uma dose 25 mg/kg, por via intragástrica.

**Grupo 3** -Diclofenaco Sódico + Amoxicilina 50: aos animais deste grupo foi administrada uma solução que proporcionou uma dose de 2,5 mg/kg de

diclofenaco sódico, por via intramuscular e uma suspensão de Amoxicilina que proporcionou 50mg/kg, por via intragástrica.

**Grupo 4** -Diclofenaco Sódico: aos animais deste grupo foi administrada uma solução que proporcionou uma dose de 2,5 mg/kg, por via intramuscular.

**Grupo 5** -Controle: aos animais deste grupo foi administrado 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, por via intragástrica.

Todas as drogas foram administradas em dose única com agulha curva<sup>10</sup> (Figura 1), 70x15, acoplada a uma seringa hipodérmica para via intragástrica ou com o auxílio de uma seringa de 1mL tipo insulina com agulha 13x4,5 para a via intramuscular. Todas as administrações ocorreram seis horas antes da retirada dos tecidos granulomatosos.



**Figura 1.** Agulha utilizada para introdução do fármaco por via intragástrica.



**4.9 - OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE  $10^8$  e  $10^{10}$  ufc/mL (GROPPO, 1996)**

1 - Foi colhida uma alçada com colônias de bactérias cultivadas em TSA inclinado, através de uma alça de platina esterilizada;

2 - A mesma foi colocada em um tubo de ensaio, contendo 10 mL de BHI e, a seguir, incubada em estufa de cultura a 37°C por 4 a 6 horas, para atingir a fase de crescimento exponencial;

3 - Após o período de incubação, uma alíquota da amostra foi diluída em solução salina de cloreto de sódio a 0,9% até a obtenção de uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 60% (equivalente a  $10^{10}$  ufc/mL, para obtenção das placas) ou 80% de transmitância (equivalente a  $10^8$  ufc/mL, para a infecção dos animais), com o espectrofotômetro<sup>11</sup> previamente zerado com água destilada e deionizada, ajustado para 800 nm de comprimento de onda;

4 - Após este procedimento de padronização, 1mL do inóculo ajustado foi transferido para 99mL de MHA (densidade final de  $10^8$  ufc/mL), com temperatura de 45°C. Após a agitação do ágar líquido inoculado, este foi dispensado em placas de Petri esterilizadas, de 20 x 150 mm (22 mL para cada placa);

---

<sup>10</sup> Arkansas.

<sup>11</sup> Bausch & Lomb – Spetronic 20

5 - Após 15 minutos em repouso para a solidificação do ágar, à temperatura ambiente, os materiais em teste puderam ser posicionados na superfície do mesmo.

### **4.10 - OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO**

Para correlacionar os diâmetros dos halos produzidos pelas amostras e a provável concentração dos antimicrobianos em estudo, foi elaborado uma curva padrão ou de regressão. Para tanto, discos de papel esterilizados, contendo concentrações em µg de 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0 e 15,0 do antimicrobiano foram dispostos, após secagem em estufa a 37°C por 1 hora, em placas contendo MHA inoculado com 10<sup>8</sup> ufc/mL de *S. aureus* ATCC 25923.

Foram dispostos quatro discos em cada placa, sendo utilizadas três placas para cada concentração, de tal forma que três valores de halo de inibição foram obtidos para cada concentração em estudo.

As placas foram levadas à estufa a 37°C, por 18 horas. Após esse período, 3 mL de cloreto de trifeniltetrazólio<sup>12</sup> a 0,1% em ágar<sup>13</sup> a 1% foram vertidos em cada placa (ITO, 1995).

Os halos foram medidos com paquímetro<sup>14</sup> e as médias foram inseridas em um programa de computador<sup>15</sup>, que gerou uma curva, com o valor de R-quadrado ( $R^2$ ) e a sua equação (diâmetro de halo de inibição em função da concentração que o originou).

### **4.11 - AMOSTRAS DE SANGUE E DOS TECIDOS GRANULOMATOSOS**

Todas as amostras foram retiradas após 14 dias de evolução do tecido granulomatoso, dois dias após a contaminação dos mesmos e após 6 horas da administração das drogas, totalizando 16 dias e 6 horas desde a implantação das esponjas de poliuretano.

Após anestesia com éter etílico, o plexo carotídeo dos animais foi seccionado, sendo colhidas amostras de 5mL de sangue em tubos plásticos de centrífuga previamente autoclavados. Estas foram submetidas à retração do coágulo a 37°C, em banho-maria. Após este procedimento foram centrifugadas, durante 10 min a 3500rpm, sendo então retiradas duas alíquotas de 10µL do soro sangüíneo resultante.

Cada amostra foi colocada em um disco de papel de filtro esterilizado (disco "blank"). Após a secagem, em estufa a 37°C, por 1 hora, os dois discos

---

<sup>12</sup> Fluka Chemie

<sup>13</sup> Biobrás

foram posicionados em placas, previamente inoculadas como anteriormente descrito no item 7.9. Os halos de inibição formados após 18 horas de incubação, em estufa a 37°C, foram medidos e seus valores anotados para análise.

Após a remoção do sangue do animal, os tecidos granulomatosos que não haviam sido contaminados previamente foram retirados. Imediatamente após, estas duas amostras eram posicionadas em placas de Petri previamente preparadas conforme o item 7.9. As amostras oriundas de cada animal foram separadas em placas distintas, dispondo-se quatro amostras de animais diferentes em cada placa, cerca de 50mm de distância uma da outra.

Após 18 horas de incubação, 3 mL de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,1% em ágar a 1% foram vertidos em cada placa. Após a solidificação, os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro, levando-se em consideração o diâmetro total do halo de inibição, incluindo o tecido.

As outras duas amostras posicionadas caudalmente, contaminadas previamente, foram colocadas cada uma em um tubo de ensaio diferente, contendo 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% esterilizada. Esses tubos eram previamente pesados. A diferença entre os pesos anotados antes e depois da introdução das amostras no seu interior permitiu estimar o peso do tecido contaminado.

---

<sup>14</sup> Starrett

Posteriormente essas amostras sofriam dispersão em um sonicador<sup>16</sup> com amplitude de 5%, funcionando durante 9,9 segundos, com intervalos de 5 segundos durante 59 segundos, perfazendo um total de 6 pulsos.

Após as amostras serem diluídas 10 e 100 vezes foram retiradas alíquotas de 10µL de cada um. Duas delas foram espalhadas em placas com 5 ml de Salt Manitol ágar, através de uma alça de vidro em forma de "L". Todas as placas foram levadas à estufa a 37°C, durante 18 horas para incubação. Decorrido este período, as colônias de *S. aureus* resultantes foram submetidas ao procedimento de contagem manual.

### 4.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias do número de colônias resultantes das infecções e as concentrações sérica e tecidual calculadas com base na equação da curva de regressão foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, com auxílio de um programa de computador<sup>17</sup>.

---

<sup>15</sup> Excel for Windows, v. 7.0, Microsoft Co., licença n.o 0494-59200 BR

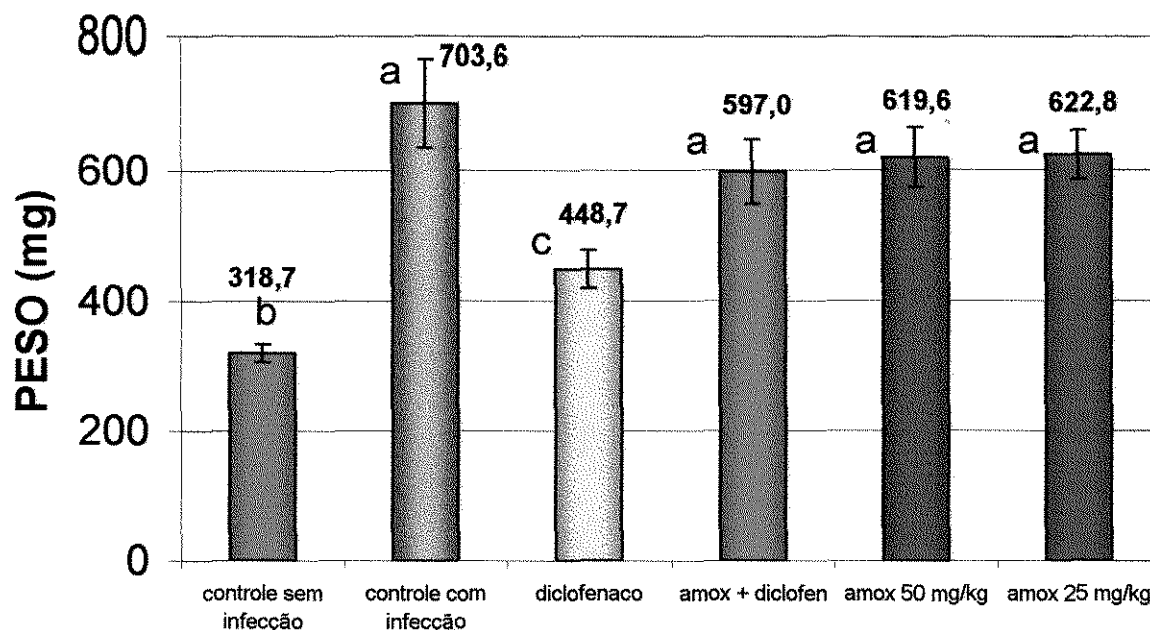
<sup>16</sup> Vibracell Co.

<sup>17</sup> Bioestat for Windows, versão 1.0

## 5. RESULTADOS

Em todos os animais foi possível observar a formação do tecido granulomatoso, sendo verificado o desenvolvimento da infecção induzida somente naqueles tecidos que receberam o inóculo de *S. aureus*.

No Gráfico 1 podem ser observadas as médias ( $\pm$  erro padrão) dos pesos úmidos dos tecidos granulomatosos (Anexo 1).



As barras de erro representam os erros padrões máximo e mínimo. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes.

**Gráfico 1.** Médias dos pesos (em mg) dos tecidos granulomatosos.

A Tabela 1 mostra os diâmetros dos halos de inibição proporcionados por diferentes concentrações do antimicrobiano, presentes nos discos. As médias obtidas foram utilizadas para a obtenção da curva de regressão.

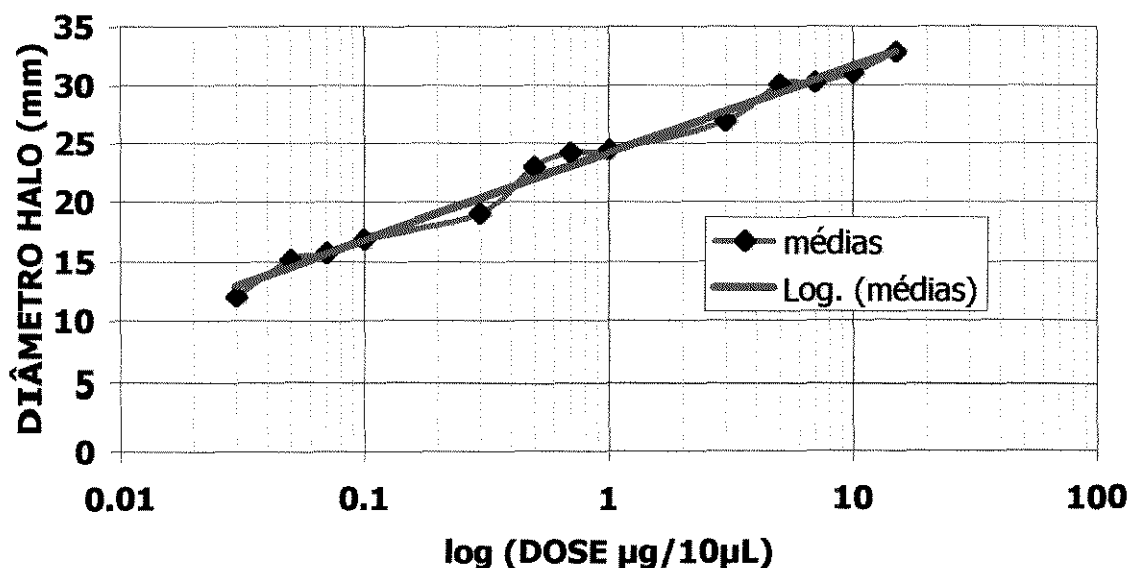
**Tabela 1**

Diâmetros em mm dos halos de inibição correlacionados com as quantidades de amoxicilina em µg.

QUANTIDADE DE AMOXICILINA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MÉDIA
0,03	12,0	12,0	12,0	12,0
0,05	15,3	15,7	14,4	15,1
0,07	15,7	14,9	15,7	15,4
0,1	17,0	15,0	18,1	16,7
0,3	19,0	19,0	19,0	19,0
0,5	22,9	23,0	23,0	23,0
0,7	24,3	24,7	24,0	24,3
1	24,2	24,2	24,8	24,4
3	27,0	27,0	26,8	26,9
5	29,0	30,9	30,2	30,0
7	30,3	30,3	30,0	30,2
10	31,0	31,0	31,0	31,0
15	33,4	33,4	31,6	32,8

A curva padrão ou de regressão (Gráfico 2), foi traçada através da correlação entre as médias de diâmetros de halo de inibição e contra o logaritmo

das concentrações de amoxicilina (Tabela 1), sendo sua equação matemática e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) estabelecidos.



**Gráfico 2.** Curva padrão ou regressão.

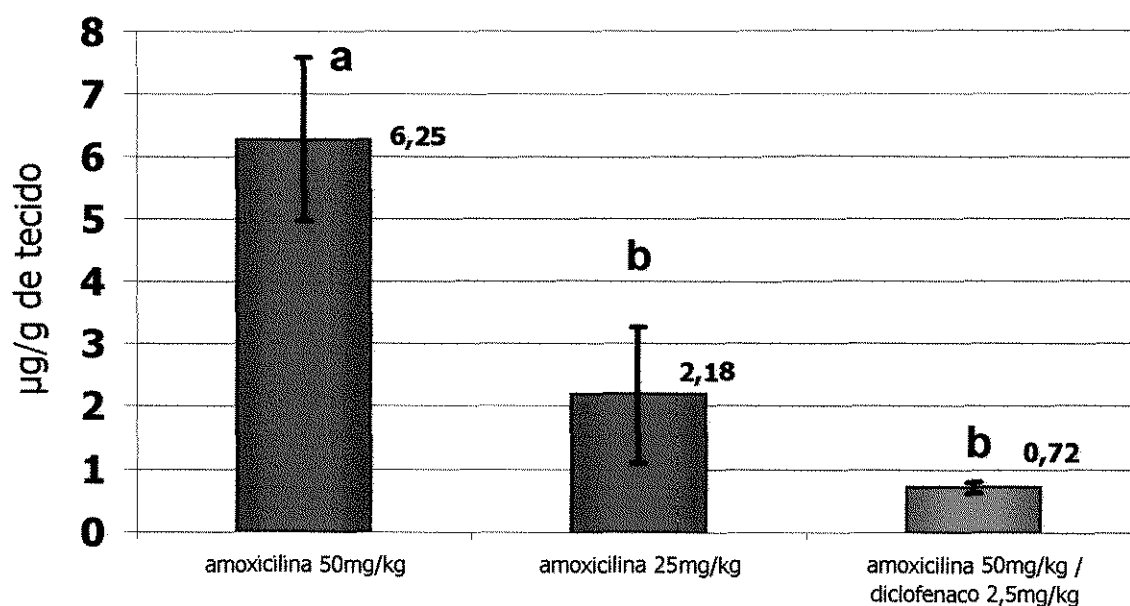
A equação obtida, a partir da curva, foi  $y = 3,2103 \ln (x) + 24,169$ , com coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) = 0,988, onde  $y$  = diâmetro do halo de inibição (mm) e  $x$ =quantidade de antimicrobiano ( $\mu\text{g}$ ). Esta relação é válida para diâmetros de halo de inibição entre 12 e 32,8mm.

Substituindo na equação, os valores de halo de inibição obtidos com as amostras de tecido granulomatoso (Anexo 2) e com as amostras sangüíneas (Anexo 3), foi possível obter a quantidade de antimicrobiano.



Correlacionando esses valores com os pesos úmidos médios do grupo controle ou considerando 10  $\mu$ L de soro sanguíneo utilizado, foi possível obter a concentração de antimicrobiano por grama de tecido ou por mL de soro, respectivamente.

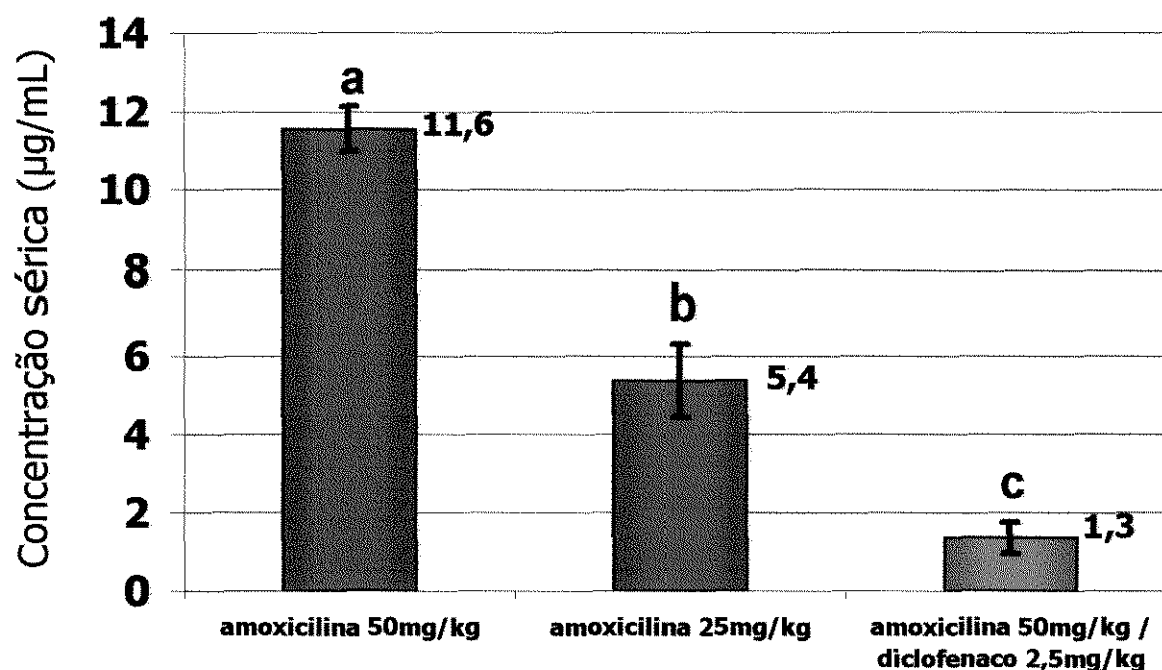
No Gráfico 3 podem ser observadas as médias das concentrações teciduais de amoxicilina nos grupos 1, 2 e 3. Nos grupos 4 (diclofenaco sódico) e 5 (controle) os valores de halo de inibição foram zero, não sendo representados no gráfico.



*As barras de erro representam os erros padrões máximo e mínimo. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes.*

**Gráfico 3.** Médias das concentrações teciduais de amoxicilina.

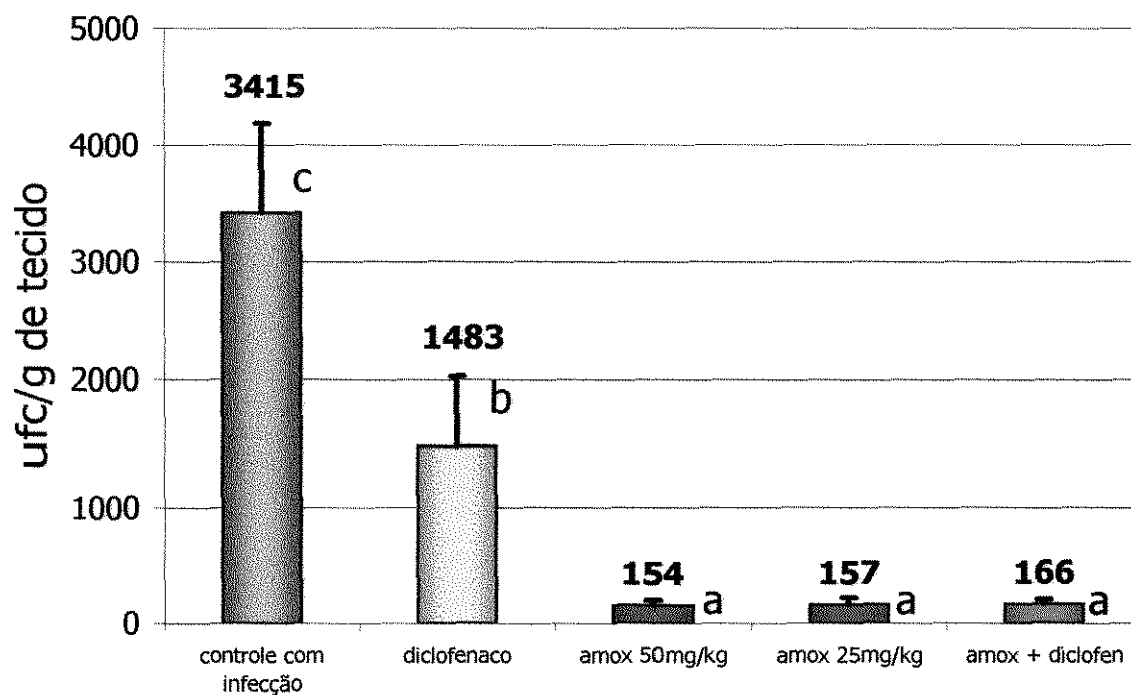
No Gráfico 4 podem ser observadas as médias das concentrações séricas de amoxicilina nos grupos 1, 2 e 3. Nos grupos 4 (diclofenaco sódico) e 5 (controle) os valores de halo de inibição foram zero, não sendo representados no gráfico.



*As barras de erro representam os erros padrões máximo e mínimo. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes.*

**Gráfico 4.** Médias das concentrações séricas de amoxicilina.

O Gráfico 5 mostra as médias das contagens de ufc (Anexo 4) nos grupos de estudo.



*As barras de erro representam os erros padrões máximo e mínimo. Letras distintas entre si representam diferenças estatisticamente significantes.*

**Gráfico 5.** Médias das contagens de microrganismos/g de tecido, nos grupos de estudo.

---

## 6. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais que utilizam a reação a algum corpo estranho podem ser válidos para avaliação do comportamento farmacocinético de antimicrobianos em conjunto com os mecanismos de defesa orgânico (ZAK & O'REILLY, 1991). Baseado neste princípio, no presente estudo foi utilizado um modelo que permitiu a dosagem do antimicrobiano no tecido livre de infecção e o efeito do mesmo sobre uma infecção com origem e dimensão conhecidas.

A implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) ou poliuretana, como agente desencadeador de tecido granulomatoso, no dorso de animais, tem sido um método utilizado para estudar fármacos antiinflamatórios (GRINDLAY & WAUGH, 1951; HICKS, 1969; VIZIOLI, 1973; ANDRADE, 1980) e antimicrobianos (GEVARTOSKY, 1984; BARROS, 1989; MATTOS-FILHO, 1990; MATTOS-FILHO *et al.*, 1994; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998), além disso, sua morfologia e seqüência de formação já foram bem estudadas (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990), tornando-o um modelo ideal.

O período de 14 dias de maturação do tecido granulomatoso foi determinado pelos achados de GROPPPO (1996), que não encontrou diferenças estatisticamente significantes observando nas concentrações de amoxicilina, em tecidos granulomatosos induzidos em ratos, em períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de evolução da lesão.

Como existem evidências de que a maior parte das infecções resulta da aderência das bactérias a uma superfície e a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão bacteriana também requer uma superfície para exercer sua atividade (LORIAN, 1989), o presente trabalho optou por provocar a infecção estafilócica no tecido granulomatoso formado, proporcionando uma superfície adequada aos agentes patogênicos.

O baixo desvio padrão (menos de 10% do valor da média), observado com relação aos pesos dos tecidos granulomatosos dos diversos grupos de estudo, indica uma variação pequena com relação à média, assegurando confiabilidade aos dados relacionados ao peso tecidual. Provavelmente, como apontado por GROPPPO (1996) e BAGLIE (1998), o fato de um só operador ter atuado na retirada destes tecidos foi responsável pela pequena diferença observada.

Como apontado por AMATO-NETO *et al.* (1985) e MONTGOMERY (1991a), um dos principais aspectos necessários ao sucesso da terapia antimicrobiana é o conhecimento da sensibilidade do agente etiológico. O microrganismo utilizado já teve sua sensibilidade à amoxicilina comprovada pela literatura (PHILIPS *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998). Antes de ser utilizada neste estudo, esta cepa teve sua pureza e sua sensibilidade novamente avaliadas, confirmando os achados anteriores.

O método microbiológico vem sendo muito utilizado, embora haja outras metodologias para a determinação da concentração de amoxicilina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988; US PHARMACOPOEIA, 1990; DEVANI *et al.*, 1992; KRAUWINKEL *et al.*, 1993; CHARLES & CHULAVATNATOL, 1993). Este método é comparável, em termos de precisão, aos ensaios com equipamentos tidos como mais precisos, como a cromatografia líquida de alta performance (HSU & HSU, 1992; MOORE *et al.*, 1996). Assim, a utilização do método microbiológico ocasionou mensurações com precisão suficiente para o propósito deste trabalho.

A presença do antiinflamatório no tecido granulomatoso determinou, apesar da infecção local, um peso menor do tecido, embora não comparável ao tecido sem infecção. Este fato é devido, provavelmente, ao alto grau de atividade antiinflamatória do diclofenaco sódico e à sua capacidade de diminuir a permeabilidade capilar (MORAN, 1990; FRANCO, 1994).

Como o diclofenaco pode inibir a migração leucocitária para o sítio inflamatório (TODD & SORKIN, 1988; KU *et al.*, 1985; KU *et al.*, 1986; FRANCO, 1994) e a produção de superóxidos (TODD & SORKIN, 1988; PERIANIN *et al.*, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986) seria provável que estes fenômenos pudessem estar correlacionados com a perda de peso tecidual.

Estranhamente, quando o diclofenaco sódico foi associado à amoxicilina o peso tecidual não exibiu diferenças com aqueles tecidos onde havia infecção. Este fato não encontra parâmetros na literatura, vez que não há estudo similar.

A lise significativa nas células bacterianas provocada pela amoxicilina não foi traduzida em um menor peso tecidual. Seria possível entender este fenômeno tomando como princípio que os antimicrobianos sozinhos não conseguem erradicar a infecção, mas apenas causar uma redução no número de microrganismos viáveis (MONTGOMERY, 1991a; ANDRADE, 1999). Embora, após seis horas da administração do antimicrobiano fosse verificada baixa significativa do número de bactérias viáveis, os mecanismos de defesa do hospedeiro, provavelmente, não haviam completado a remoção dos microrganismos mortos, aumentando assim o peso tecidual.

A associação com a amoxicilina pode ter interferido com a ação antiinflamatória do diclofenaco sódico, provocando o aumento do peso tecidual, pois, como observado no presente estudo, o diclofenaco sódico diminuiu as concentrações sérica e tecidual da amoxicilina.

Por outro lado, como o diclofenaco é extensa e rapidamente metabolizado no fígado (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988; RIESS *et al.*, 1978; STIERLIN *et al.*, 1979; FRANCO, 1994), esta metabolização hepática poderia ser a responsável pela diminuição das concentrações sérica e tecidual da amoxicilina.

Além disso, uma das potentes ações antiinflamatórias do diclofenaco é a sua capacidade de diminuir a permeabilidade vascular, fato que poderia alterar a difusão da amoxicilina para o interior do tecido (TODD & SORKIN, 1988; KU *et al.*, 1985; KU *et al.*, 1986; FRANCO, 1994).

As concentrações sérica e tecidual observadas foram similares às aquelas observada por BAGLIE (1998) sob condições metodológicas também similares. Este autor observou 4 e 2,67 µg/g, após 4 e 6 horas da administração de uma dose única de 40mg/kg em ratos, respectivamente. As concentrações séricas nestes mesmos períodos (9,62 e 9,28 µg/mL) também apresentaram similaridade.

Em humanos, o estudo da farmacocinética da amoxicilina, após uma única dose de 40 mg/kg mostrou concentrações plasmáticas, após 4 e 6 horas, na faixa 10,7 e 3,7 µg/mL (DAJANI *et al.*, 1994), dados similares aos encontrados no presente estudo.

As observações de BAGLIE (1998) acerca da proporcionalidade entre as concentrações sérica e tecidual, se repetiram no presente estudo, pois pôde ser verificada uma relação diretamente proporcional entre as mesmas.

Os presentes resultados vão ao encontro da observação de que a concentração tecidual normalmente eleva e diminui mais lentamente nas primeiras horas após a administração, sendo as concentrações séricas mais altas do que os



níveis do fluido intersticial (tecidual), podendo haver inversão deste comportamento com a passagem do tempo (DAVEY, 1990).

Os grupos de estudo que utilizaram a amoxicilina a 25 ou 50mg/kg, independente da associação com o diclofenaco sódico, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes com relação à redução do número de microrganismos viáveis (ufc), embora tenha sido verificada a redução da concentração tecidual e sérica da ordem de 88%. Isto pode ser explicado pelo fato de que, mesmo em face de uma redução deste porte, as concentrações séricas e teciduais resultantes estavam acima da concentração inibitória mínima para o microrganismo utilizado, que é da ordem de 0,06 a 1µg/mL (PHILIPS *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998).

Além disso, embora tenha reduzido as concentrações de amoxicilina, o diclofenaco sódico tem também boas propriedades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas e negativas, como demonstrado previamente *in vitro* (ANNADURAI *et al.*, 1998).

Embora não tenha sido medida a concentração sérica e/ou tecidual do diclofenaco no presente estudo, a concentração inibitória mínima para a maioria dos microrganismos (50 a 100µg/mL) pode ser facilmente atingida *in vivo* (ANNADURAI *et al.*, 1998). A redução significativa do número de microrganismos,

provocada pelo diclofenaco sódico com relação ao grupo controle, pode comprovar os dados obtidos *in vitro* por estes autores.

Apesar de ter resultado em um número pequeno de ufc/mL, a utilização da amoxicilina nas doses empregadas não foi capaz de reduzir totalmente o número de microrganismos, erradicando a infecção. Este fato ocorreu porque, em áreas onde a infecção está contida pelos mecanismos de defesa do organismo, as bactérias multiplicam-se em velocidade extremamente lenta dificultando a ação das penicilinas que necessitam da divisão celular para atuar (MONTGOMERY, 1991a; ANDRADE, 1999).

## **7. CONCLUSÃO**

Baseado nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 - O método microbiológico permitiu medir os níveis séricos de antimicrobiano após 6 horas da administração das drogas.
- 2 - O método mostrou-se válido para avaliar a difusão e para quantificar a amoxicilina em nível tecidual;
- 3 - Houve uma correlação diretamente proporcional entre as concentrações sérica e tecidual da amoxicilina, embora a concentração tecidual não tenha sido determinante para a redução do número de microrganismos da infecção;
- 4 - As concentrações de amoxicilina empregadas neste estudo, bem como sua associação ao diclofenaco sódico, permitiram uma redução significativa do número de microrganismos da infecção estafilocócica induzida, sendo que a interação entre o antiinflamatório e o antimicrobiano afetou negativamente as concentrações sérica e tecidual do último.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>**

1. AKIMOTO, Y., KANEKO, K., TAMURA, T. Amoxicillin concentrations in serum, jaw cyst, and jawbone following a single oral administration. J oral maxillofac Surg, Orlando, v.40, n.5, p.287-293, May 1982.
2. \_\_\_\_\_. *et al.* Amoxicilin concentration in pus from abcess caused by odontogenic infection. Gen Pharmac, Bristol, v.25, n.1, p.111-113, Jan. 1994.
3. AMATO-NETO, V. *et al.* Antibióticos na prática médica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1985.
4. ANNADURAI, S. *et al.* Antibacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium. Indian J Exp Biol, New Delhi, v.36, p.86-90, Jan. 1998.
5. ANDRADE, E.D. Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias. Piracicaba, 1980. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
6. \_\_\_\_\_. Terapêutica Medicamentosa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, 1999.
7. ATKINSON, D.C., COLLIER, H.O.J. Salicylates: Molecular mechanism of therapeutic action. Adv Pharmacol, New York, p.233-288, 1980.

---

<sup>1</sup> De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos periódicos conforme o "Medline".

8. BAGLIE, S. Biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo *ex vivo*, em ratos. Piracicaba, 1998. 60p. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
9. BALOWS, A. Current techniques for susceptibility testing. Springfield: C.C. Thomas. 1974. p.3-5. Apud PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 66.
10. BARROS, P.P. Estudo da influência da tripsina, quimotripsina e paracetamol, no desenvolvimento do tecido de granulação, em ratos. Piracicaba, 1989. 94p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
11. BARZA, M., WEINSTEIN, L. Penetration of antibiotics into fibrin loci *in vivo*. I. Comparison of penetration of ampicillin into fibrin clots, abscesses, and interstitial fluid. J Infec Dis, Chicago, v.129, n.1, p.59-65, Jan. 1974.
12. BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. Am J Clin Path, Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966. Apud: PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 66.
13. BÔER, J.J.H. *et al.* Amoxicillin pharmacokinetics in preterm infants with gestational ages of less than 32 weeks. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.39, n.2, p.431-434, Feb. 1995.
14. BONDI, A. *et al.* Routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Am J Med Sci, Philadelphia, v.213, p.221-225, 1947. Apud PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 66.
15. BRITISH PHARMACOPOEIA. Her majesty's stationary office. London, v.1, p.31-32, 1988.

16. CARDWELL, J.R. Efficacy and safety of diclofenac sodium in rheumatoid arthritis: Experience in the United States. Am J Med, Newton, v.80, p.43-47, 1986.
17. CARNEY, D.N. *et al.* Bacteremia due to Staphylococcus aureus in patients with cancer: report on 45 cases and a review of the literature. Rev Infect Dis, Chicago, v.4, n.1, p.1-12, Jan./Feb. 1985.
18. CHARLES, B., CHULAVATNATOL, S. Simple analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection. Biomed Chromatogr, London, v.7, n.4, p.204-207, July 1993.
19. CHOMARAT, M. *et al.* Tonsillar diffusion kinetics of amoxycillin after oral administration of 1g to adults. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, Geneva, v.22, n.2, p.141-144, 1997.
20. CROYDON, E.A.P., SUTHERLAND, R. Alfa-amino-p-hydroxybenzyl- penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin: absorption and excretion in man. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.10, p.427-430, 1970.
21. DAJANI, A.S., BAWDON, R.E., BERRY, M.C. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? Clin Inf Dis, Chicago, v.18, n.2, p.157-160, Feb. 1994.
22. \_\_\_\_\_. *et al.* Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. J Am Med. Ass, Chicago, v.277, n.22, p.1794-1801, June 1997.
23. DAVEY, P. Tissue penetration. Practitioner, London, v.234, n.1497, p.1067-1069, Dec. 1990.

- 
- 24.DEVANI, M.B., PATEL, I.T., PATEL, T.M. Spectrophotometric determination of amoxicillin and its dosage forms. J Pharm Biomed Anal, Oxford, v.10, n.5, p.355-358, May 1992.
- 25.EAGLE, H., FLEISCHMAN, R., LEVY, M. "Continuous" vs "discontinuous" therapy with penicillin. The effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. N Engl J Med, Lawrence, v.248, p.481-488, 1953. Apud BARZA, M., WEINSTEIN, L. Op. cit. Ref. 11.
- 26.FARIAS, W.V. *et al.* Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from 12 hospitals. Rev Assoc Med Bras, São Paulo, v.43, n.3, p.199-204, jul./set. 1997.
- 27.FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORREA, F.M.A. Central and peripheral analgesic action of aspirin-like drugs. Eur J Clin Pharmacol, Berlin, v.53, p.39-48, 1978.
- 28.FISHMAN, L.S., HEWITT, W.L. The natural penicilline. Med clin N Am, Philadelphia, v.54, n.5, p.1081-1099, Sept. 1970.
- 29.FONSECA, A.L. Antibióticos na clínica diária. 3.ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1988.
- 30.FRANCO, L.M. Determinação de bioequivalência de diferentes formulações de diclofenaco de potássio. Campinas, 1995. 90p. Tese (Mestrado em Ciências- Área de Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas da Univesidade Estadual de Campinas.
- 31.FRIMAN, C., JOHNSTON, C., CHEW, C. Effect of diclofenac sodium, tolfenamic acid and indomethacin on the production of superoxid induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in normal human polymorphonuclear leucocytes. Scand J Rheumatol, Stockholm, v.15, p.41-46, 1986.

32. GEIGY. Voltaren® prescribing information. Ardsley, New York, July, 1988.
33. GEVARTOSKY, I.M. Estudo histológico dos efeitos de três drogas antibióticas sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos, por meio da implantação de esponja. Piracicaba, 1984. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
34. GIBALDI, M., SCHWARTZ, M.A. Apparent effect of probenecid on the distribution of penicillins in man. Clin Pharmac Ther, Saint Louis, v.9, p.345-349, 1968. Apud BARZA, M., WEINSTEIN, L. Op. cit. Ref. 11.
35. GRINDLAY, J.H., WAUGH, J.M. Plastic sponge with acts as a framework for living tissue. Archs Surg, Chicago, v.63, p.288-293, 1951.
36. GROppo, F.C. Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos. Piracicaba, 1996. 70p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
37. HICKS, R. The evaluation of inflammation induced by material implanted subcutaneously in the rat. J Pharm Pharmac, London, v.21, n.9, p.581-588, Sept. 1969.
38. HSU, M.C., HSU, P.W. High-performance liquid chromatografic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.36, n.6, p.1276-1279, June 1992.



39. ITO, I.Y. *et al.* TTC: cloreto de trifeniltetrazolio na detecção da atividade antimicrobiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 12., 1995, Águas de São Pedro. Anais ... Águas de São Pedro: SBPqO, 1995. p.106 [Abstract, 210].
40. KAMIYA, Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. East Afr Med J, Kenya, v.74, n.3, p.174-176, Mar. 1997.
41. KARLOWSKY, J., FERGUSON, J., ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. J Can Dent Ass, Ottawa, v.59, n.3, 292-294, Mar. 1993.
42. KONEMAN, E.W. *et al.* Introduction to diagnostic microbiology. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1992.
43. KOROLKOVAS, A. Análise farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
44. KRAUWINKEL, W.J.J., KAMERMANS-VOLKERS, N.J., ZIJTVELD, J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. J Chromatogr A, Amsterdam, v.617, n.2, p.334-338, Aug. 1993.
45. KU, E.C., LEE, W., KOTHARI, H.V. The effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid metabolism. Semin Arthritis Rheum, Philadelphia, v.15, p.36-41, 1985.
46. \_\_\_\_\_. *et al.* The effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. Am J Med, Newton, v.80, p.18-23, 1986.

47. LEWIS, M.A.D., MCGOWAN, D., MACFARLANE, T.W. Short-course high-dosage amoxycillin in the treatment of acute dento-alveolar abscess. Br dent J, London, v.161, n.8, p.299-302, Oct. 1986.
48. LORIAN, V. *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the culture medium. J Clin Microbiol, Washington, v.27, n.11, p.2403-2406, Nov. 1989.
49. MCCARTNEY, A.C. Changing trends in infective endocarditis. J Clin Path, London, v.45, n.11, p.945-948, Nov. 1992.
50. MARTINI, A., BONDIOLOTTI, G.P., SACERDOTE, P. Diclofenac increases beta-endorphin plasma concentrations. J Int Med Res, Northampton eng, v.12, p.92-95, 1984.
51. MATTOS FILHO, T.R. Efeitos da administração oral de enzimas proteolíticas e paracetamol no tecido de granulação de ratos. Piracicaba, 1990. 122p. Tese (Livre-Docência em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
52. \_\_\_\_\_, RANALI, J., BARROS, P.P. Presence of antibiotic in granulation tissue. J Dent Res, Washington v.73, n.4, p.773, Apr. 1994.
53. MENASSÉ, R., *et al.* Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. Scand J Rheumatol, Stockholm, v.22, p.5-16, 1978.
54. MONCADA, S., FLOWER, R.J., VANE, J.R. Prostaglandins, prostacilin, thromboxane A<sub>2</sub>, and leukotrienes. In: GILMAN A.G.; GOODMAN L.S.; RALL T.W. *et al.*, eds Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 7.ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1985, p.660-673.

55. MONTGOMERY, E.H. Antibióticos antibacterianos. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a. p.412-446.
56. \_\_\_\_\_. Princípios e mecanismos da antibioticoterapia. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991b. p.397-411.
57. MOORE, T.D. *et al.* Stability of amoxicillin-clavulanate in bactec mdium determined by high-performance liquid chromatography and bioassay. J Clin Microbiol, Washington, v.34, n.5, p.1321-1322, May 1996.
58. MORAN, M. An observer-blind comparison of diclofenac potassium, piroxicam and placebo in the treatment of ankle sprains. Curr Med Res Opin, Hampshire, v.12, p.268-274, 1990.
59. NEU, H.C. Penicilinas - microbiologia, farmacologia e uso clínico. In: KAGAN, B.M. Terapia antimicrobiana. 3.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1982. Cap.3, p.17-29.
60. \_\_\_\_\_. WINSHELL, E.B. *In vitro* antimicrobial activity of 6[d(-) a-amino-p-hydroxyphenylacetamido] penicillanic acid, a new semisynthetic penicillin. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.10, p.407-410, 1970a.
61. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Pharmacological studies of 6[d(-)a-amino-p-hydroxyphenylacetamido] penicillanic acid in humans. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.10, p.423-426, 1970b.
62. NIX, D.E. *et al.* Antibiotic tissue penetration and its relevance: impact of tissue penetration on infection response. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v. 35, n. 10, p.1953-1959, Oct. 1991.

63. PERIANIN, A., GOUGEROT-POCIDALO, M.A., GIROUD, J.P. Diclofenac sodium, a negative chemokinetic factor for neutrophil locomotion. Biochem Pharmacol, Oxford, v.34, p.3433-3438, 1985.
64. PERL, T.M., GOLUB, J.E. New approaches to reduce *Staphylococcus aureus* nosocomial infection rates: treating *S. aureus* nasal carriage. Ann Pharmacother, Cincinnati, v.32, n.1, p.S7-S16, Jan. 1998.
65. PHILIPS, I. *et al.* A guide to sensitivity testing. J Antimicrob Chemother, London, v.27, p.1-50, 1991 [Supplement D].
66. PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J Appl Bact, Oxford, v.68, n.4, p.307-318, Apr. 1990.
67. PIEPER, R. *et al.* Penetration of penicillins into cardiac valves and auricles of patients undergoing open-heart surgery. Scand J Thorac Cardiovasc Surg, Stockholm, v.19, n.1, p.49-53, 1985.
68. RENNEBERG, J. Definitions of antibacterial interactions in animal infection models. J Antimicrob Chemother, London, v.31, p.167-175, May. 1993. [Supplement D].
69. \_\_\_\_\_. WALDER, M. Mouse model for evaluation of antibiotic treatment of acute and chronic infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, Wiesbaden, v.7, n.6, p.753-757, Dec. 1988a.
70. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. A mouse model for simultaneous pharmacokinetic and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. J Antimicrob Chemother, London, v.22, p.51-60, 1988b.

71. RIESS, W., *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. Scand J Rheumatol, Stockholm, v. 22, p.17-29, 1978.
72. ROBSON, M.C. *et al.* The efficacy of sistemics antibiotics in the treatment of granulating wounds. J Surg Res, San Diego, v.16, n.4, p.299-306, Apr. 1974.
73. ROMAN, R.S. *et al.* Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. Clin Infect Dis, Chicago, v.25, n.3, p.698-705, 1997.
74. SACERDOTE, P., MONZA, G., MANTEGAZZA, P. Diclofenac and pirofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations. Pharmacol Res, London, v.17, p.679-684, 1985.
75. STIERLIN, H., FAIGLE, J.W., SALLMANN, A. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man: isolation and identification of principal metabolites. Xenobiotica, London, v.9, p.611-621, 1979.
76. SUTHERLAND, R., ROLINSON, G.N.  $\alpha$ -Amino-p-hydroxybenzyl penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin: *in vitro* evaluation. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.10, p.411-415, 1970.
77. TIITINEN, S., NISSILA, M., RUUTSALO, H.M. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the renal excretion of uric acid. Clin Rheumatol, Brussels, v.2, p.233-236, 1983.
78. TODD, P.A., SORKIN, E.M. Diclofenac sodium: a reapraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, therapeutic efficacy. Drugs, Auckland, v.35, p.244-285, 1988.

79. TOPAZIAN, R.G., GOLDBERG, M.H. Oral and maxillofacial infections. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1987. Apud: KARLOWSKY, J., FERGUSON, J., ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. J Can Dent Ass, Ottawa, v.59, n.3, p.292-299, 1993.
80. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. The national formulary XVII, Rockville, p.80-84, 1990.
81. VIZIOLI, M.R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. Acta anat, Basel, v.85, n.3, p.358-377, 1973.
82. WILLIS, J.V, KENDALL, M.J, FLINN, R.M. The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. Eur J Clin Pharmacol, Berlin, v.16, p.405-10, 1979.
83. \_\_\_\_\_. *et al.* The influence of food on the absorption of diclofenac as determined by the urinary excretion of the unchanged drug and its major metabolites during chronic administration. Eur J Clin Pharmacol, Berlin, v.19, p.39-44, 1981.
84. ZAK, O., O'REILLY, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, London, v.35, n.8, p.1527-1531, Aug. 1991.
85. ZUCKNER, J. International experience with diclofenac in rheumatoid arthritis. Am J Med, Newton, v.80, p. 39-42, 1986.

## ANEXOS

## ANEXO 1

TABELA 2

Pesos úmidos (em mg) dos tecidos granulomatosos dos grupos estudados.

	Amox 50		amox 25		diclofen		amox +		controle com		controle sem	
	mg/kg		mg/kg		2,5 mg/kg		diclofen		infecção		infecção	
animal	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2
1	504,6	739,2	662,4	569,6	397,5	382,0	699,8	400,1	436,4	690,1	260,0	292,8
2	665,3	563,5	653,7	832,1	577,0	536,6	507,9	650,2	1145,7	849,8	403,2	323,1
3	421,2	481,0	552,1	816,9	275,8	426,1	447,1	510,2	627,0	778,6	331,7	364,8
4	605,5	538,0	579,5	495,8	570,2	483,7	443,1	442,9	963,2	789,3	298,9	359,6
5	1016,7	702,9	564,1	501,5	413,8	423,7	540,0	802,8	823,4	570,8	366,8	303,1
6	687,8	508,7	--	--	--	--	815,3	904,2	340,4	428,6	266,3	253,8
média	650,2	588,9	602,4	643,2	446,9	450,4	575,5	618,4	722,7	684,5	321,2	316,2
média grupo	619,6		622,8		448,7		597,0		703,6		318,7	

## ANEXO 2

TABELA 3

Valores de halo de inibição (em mm) obtidos com as amostras de tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.

animal	amoxicilina 50 mg/kg		amoxicilina 25 mg/kg		amoxicilina + diclofenaco	
	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2
1	26,5	27,4	21,4	19,3	20	21
2	22,4	24,5	---	23	20	19
3	25,5	25,7	24	28,2	16	20
4	21,4	26,8	20,6	17,2	16	20
5	22,7	27,6	17	17,4	21	17
6	29,9	27,8	---	---	19	18
média	24,7	26,6	20,8	21	18,7	19,2



**TABELA 4**

Valores de concentração tecidual de amoxicilina (em µg/g) obtidos com os valores constantes na Tabela 3 através da curva padrão.

animal	amoxicilina 50 mg/kg		amoxicilina 25 mg/kg		amoxicilina + diclofenaco	
	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2	gran 1	gran 2
1	6,3	8,2	1,3	0,7	0,9	1,2
2	1,8	3,4	---	2,1	0,9	0,6
3	4,6	4,9	2,9	10,5	0,3	0,9
4	1,3	6,9	1	0,4	0,3	0,9
5	2	8,8	0,3	0,4	1,2	0,3
6	17,7	9,3	---	---	0,6	0,5
média	5,6	6,9	1,4	2,8	0,7	0,7
média do grupo	<b>6,25</b>		<b>2,1</b>		<b>0,7</b>	

**ANEXO 3****TABELA 5**

Valores de halo de inibição (em mm) obtidos com as amostras sangüíneas, provindas dos animais e a média dentro de cada grupo.

	amoxicilina 50 mg/kg	amoxicilina 25 mg/kg	amoxicilina + diclofenaco
1	17,3	13,9	7,0
2	17,7	17,1	7,0
3	16,9	13,7	8,0
4	17,5	12,0	7,0
5	15,8	14,0	7,0
6	17,0	15,2	11,9
7	17,3	14,6	12,6
8	17,3	14,6	12,7
9	17,3	---	---
10	17,3	---	---
11	16,6	---	---
<b>média</b>	<b>17,1</b>	<b>14,4</b>	<b>9,1</b>

**TABELA 6**

Valores de concentração sérica de amoxicilina (em µg/mL) obtidos com os valores constantes na Tabela 5 através da curva padrão.

	amoxicilina 50 mg/kg	amoxicilina 25 mg/kg	amoxicilina + diclofenaco
1	11,95	4,22	0,51
2	13,5	11,24	0,51
3	10,57	3,97	0,69
4	12,7	2,36	0,51
5	7,55	4,31	0,51
6	10,9	6,38	2,29
7	11,93	5,15	2,79
8	11,93	5,23	2,91
9	11,93	---	---
10	14,57	---	---
11	9,61	---	---
<b>média</b>	<b>11,6</b>	<b>5,4</b>	<b>1,3</b>

## ANEXO 4

TABELA 7

Número de unidades formadoras de colônias/grama de tecido obtidos com as amostras, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.

amox 50mg/kg	amox 25mg/kg	diclofen 2,5mg/kg	amox + diclofen	controle com infecção
396,4	0	1056,6	44,7	6874,4
0	0	6585,8	90,3	12106,1
356,1	18,1	362,6	555,6	606,1
594,6	0	0	12,3	1142
196,7	0	72,5	328,7	1603,1
14,5	0	1006,3	452,9	3276,8
574,7	15,3	9618,7	67,1	6651
45,1	108,7	362,6	90,3	638
255,7	51,8	175,4	0	934,4
14,5	17,7	217,5	25	1311,6
0	0	0	399,9	579,6
0	60,1	931,8	254,8	6001,4
207,9	12,2	469,4	180,6	760,2
0	0	1860,7	37,4	5431
0	717,9	755,3	22,1	886,6
0	175,6	78,5	25	2318,5
13,5	240,4	2422,7	411,6	9296,3
185,9	122,4	234,7	270,9	380,1
199,2	605,1	1385,2	0	6657,3
19,7	997	2053,3	55,3	839,9
<b>média</b>	<b>153,7</b>	<b>157,1</b>	<b>166,2</b>	<b>3414,7</b>